

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

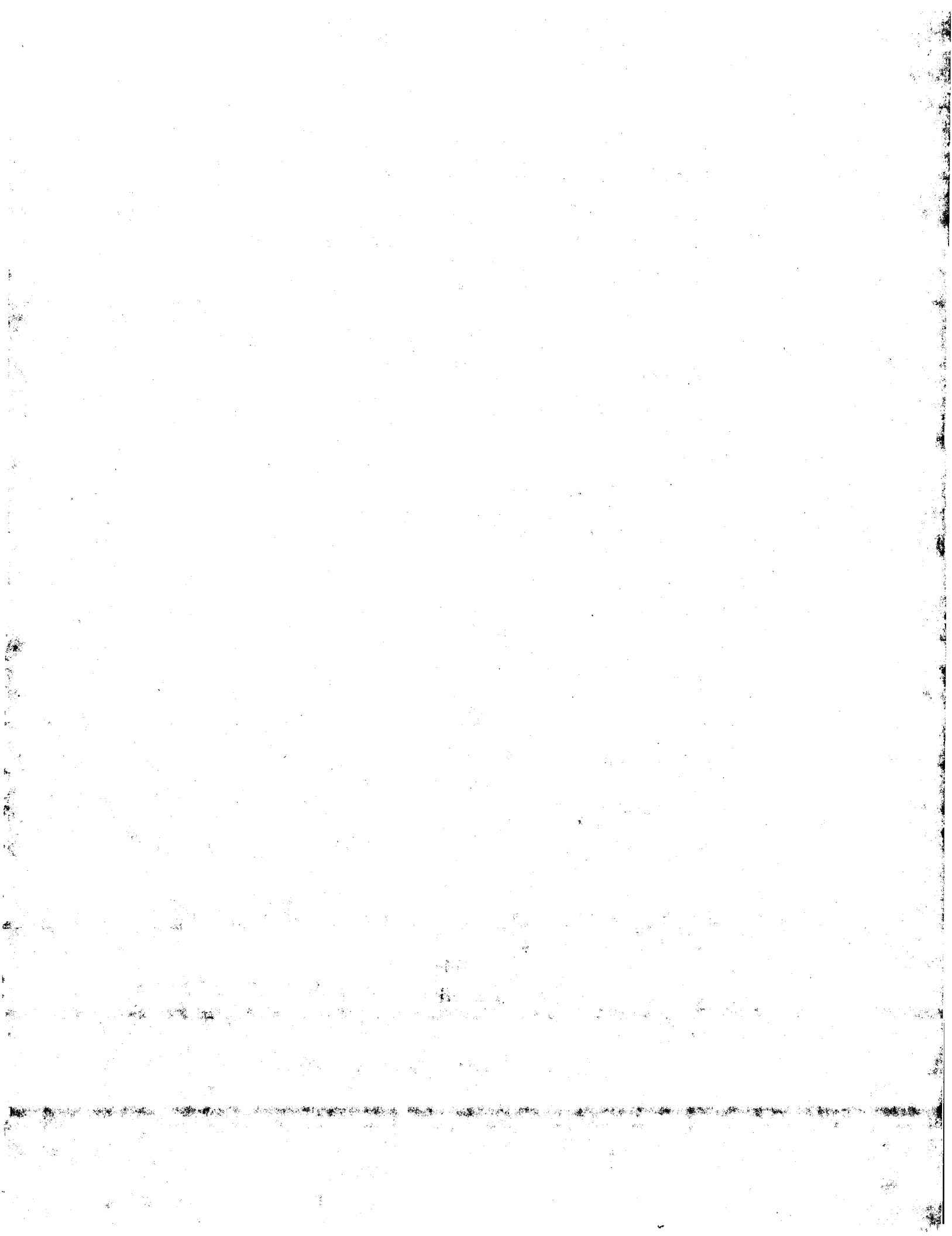
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

DE 99/1684

Bescheinigung

5

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen
Rechts in Heidelberg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der
Bezeichnung

"Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen"

09/701618

am 3. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 12 N 15/79 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt**Der Präsident**

Im Auftrag

Zeichen: 198 24 811.3

Weihmayr

Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2543

Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen, insbesondere Tumorzellen.

5

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser unterliegt einer genauen Regulation, wobei Apoptose induziert bzw. inhibiert werden kann.

15

Die Induktion von Apoptose kann bekanntermaßen über eine Reihe von sog. Todesrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die eine "Death Domain" (DD) enthalten, wie CD95, TNF-RI, DR3, DR4 oder DR5, erfolgen, die nach Bindung ihrer Liganden Apoptose-Signalwege induzieren. Beispielsweise interagiert nach Bindung des CD95-Liganden der CD95-Rezeptor mit dem Adapterprotein FADD/MORT1, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE/Caspase-8, am DISC "Death Inducing Signalling Complex" induziert werden. FADD und FLICE enthalten jeweils "Death Effector Domains" (DED). Die Induktion der Apoptose über diese Apoptose-Signalwege ist von außen beispielsweise durch die Gabe von Zellgiften (cytotoxischen Substanzen), Bestrahlung, Viren, Entzug von Wachstumsfaktoren oder mechanische Zellverletzung möglich. Diese Möglichkeiten der Apoptose-Induktion sind allerdings von bestimmten Nachteilen begleitet. So führt die Gabe von Zellgiften, wie Zytostatika, oder die Bestrahlung bei Krebszellen zur Resistenzentwicklung und darüberhinaus zu einer Schädigung normaler Zellen, bei denen eigentlich keine Apoptose ausgelöst werden sollte.

25

So besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit der Apoptose, z.B. zur Bekämpfung von malignem Wachstum, unter Reduktion der oben beschriebenen Nebenwirkungen ausgelöst werden kann.

30

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen der Erfinder, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein vorliegt, das sich zur Induktion von Apoptose eignet. Ein solches Protein weist eine Größe von ca. 16 kD auf und wurde bisher als DNA-bindendes Protein charakterisiert (Nehls et al., Nucleic Acids Research, 26, S. 1160-1166 (1998).

Von den Erfindern wurde erkannt, daß das zur Induktion von Apoptose geeignete Protein (nachstehend mit C1D bezeichnet) in jeder Zelle, auch in Tumorzellen vorhanden ist, und dort in einer vom Organismus vorgegebenen Menge exprimiert wird. Kommt es zu einer Überexpression des C1D-Genprodukts wird in den überexprimierenden Zellen Apoptose ausgelöst. Aber gerade in Tumorzellen ist eine durch Überexpression erzielte Apoptose wünschenswert. Diese Überexpression kann per se die Tumorzellen abtöten. Weiter könnte sie die durch die übliche Tumorbehandlung, wie Chemotherapie oder Bestrahlung, bewirkte Apoptose verstärken. Außerdem könnte in Tumorzellen Apoptose bewirkt werden, bei denen sich durch übliche Behandlungswege schon eine Resistenz entwickelt hat. Von den Erfindern wurde jetzt herausgefunden, daß die Auslösung von Apoptose dadurch bewirkt werden kann, daß das C1D-Gen zur Überexpression gebracht wird, d.h. die Konzentration der zellulären C1D-Genprodukts erhöht wird. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß die Zellen mit Expressionskonstrukten transfiziert werden, die das C1D-Gen exprimieren oder das endogene C1D-Gen zur Überexpression stimuliert wird.

Das C1D-Genprodukt umfaßt die Sequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende Aminosäuresequenz, deren DNA-Sequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Bezüglich des Begriffs "hybridisiert" wird auf die nachstehenden Ausführungen verwiesen.

Für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere eine für

C1D kodierende Nukleinsäure in Form einer DNA, insbesondere cDNA, geeignet. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 5
- (a) Die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

10

Die Sequenzdaten der C1D cDNAs gemäß Fig. 1 bzw. 2 sind in der Genbank unter den folgenden Accessionnummern verfügbar:

Maus cDNA: X95591;

Mensch cDNA: X95592

15

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert. Die DNA kann sich von der DNA von Fig. 1 oder 2 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen, z.B. alternatives Splicing, unterscheiden. Erfindungsgemäß umfaßt der Begriff "DNA" auch Fragmente dieser DNA. Der Begriff "Fragment" soll einen Ausschnitt bzw. Segment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch dieses Fragment codierte Protein noch die Apoptose auslösenden Eigenschaften von C1D aufweist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989). Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologische Aktivität der Apoptose-Induktion verfügt, z.B. durch Nachweis von

20

25

30

Apoptose-typischem Zelltod gekennzeichnet durch z.B. Morphologie, multizentrische Chromatinkondensation, typische Membranveränderungen und endogene DNA-Degradation.

5 Der Ausdruck "DNA mit hybridisiert" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Der Begriff "hybridisieren" bezieht sich dabei auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 10 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., supra). 15 Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

Um das C1D-Genprodukt herzustellen, das zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, wird die für C1D kodierende DNA in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert, z.B. pBlueScript, pQE8, pUC- oder pBr322-Derivate. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, 20 typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Eukaryonten zählen der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, sowie CMV- oder SV40-Enhancer. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. 25

30 In einer für gentherapeutische Zwecke bevorzugten Ausführungsform ist der die C1D-DNA enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-

Virus oder Adeno-abhängige Parvoviren (AAV). Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682).

Allgemeine auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressions- und insbesondere Gentherapievektoren, die die oben genannten Nucleinsäuremoleküle und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Der Fachmann weiß somit, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann. Beispielsweise in Form eines Fusionsproteins, bei dem der andere Teil GFP (das grün fluoreszierende Protein von Aequorea Victoria) ist.

Für die Expression des C1D-Gens werden die oben genannten Expressionsvektoren in Wirtszellen eingeführt. Zu diesen Wirtszellen zählen Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen, sowohl in Kultur wie auch im lebenden Organismus. Bevorzugt sind die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur Erkennung erfolgter Transformation und Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und

zu reinigen.

Um das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, wird in einer bevorzugten Ausführungsform die C1D-DNA in einen Expressionsvektor, insbesondere einen Gentherapievektor, inseriert und in Zellen, bevorzugt Tumorzellen, eingeführt. Dort kommt es zur Expression von C1D-Protein, das zusätzlich zum zelleigenen Protein, zur Auslösung von Apoptose führt. Das Einbringen der Vektoren in die Zellen erfolgt unter den dem Fachmann bekannten Bedingungen. Hinsichtlich der in-vivo Gentherapie wird insbesondere auf "K.W. Culver, Gene Therapy, A Handbook for Physicans, Mary Ann Libert, Inc., New York , 1994" und "P.L. Chang, Sonatic Gene Therapy, CRC Press, London, 1995" verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das zelleigene C1D-Gen zu einer vermehrten Expression stimuliert, z.B. durch exogene Stimulation des endogenen C1D-Promoters. Als Promoter bezeichnet man 5'-Nachbarsequenzen eines Gens, die als Startpunkte der RNA Polymerase II dienen, welche im Zusammenwirken mit Transkriptionsfaktoren die Expression des Gens bewirkt. Bei vielen Genen, wie auch bei C1D, ist dieser Prozeß durch exogene Faktoren induzierbar bzw. stimulierbar. Faktoren, die die spezifische Expression eines Gens bewirken sind sehr zahlreich und reichen von physikalischen Faktoren (wie Licht, Wärme, Kälte), über niedermolekulare anorganische Stoffe (wie Salze, Metallionen) und niedermolekulare organische Stoffe (Peptide, Nukleinsäurebausteine, biogene Amine, Steroide) bis zu höhermolekularen Stoffen (Serum, Wachstumsfaktoren, Immun-Stimulantien). Die für das C1D-Gen spezifischen Stimulantien werden dadurch erkannt, daß 5'-Nachbarsequenzen, vorhanden auf z.B. den BAC (bacterial arteficial chromosome) Klonen mit einem Reporter-gen, z.B. CAT oder EGFP, kombiniert und hinsichtlich der Reporter-gen-Expression bzw. deren Stimulation durch exogene Faktoren, ggf. mit einem "high-throughput"-Verfahren, untersucht werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung erstmalig eine Möglichkeit bereit, Apoptose nicht über die üblichen Signalwege auszulösen, sondern durch Überexpression

eines bestimmten Gens. Dies kann eine besondere Bedeutung bei vielen Erkrankungen haben, insbesondere Tumorerkrankungen. Insbesondere hat sich als vorteilhaft herausgestellt, daß Tumorzellen auf eine Überexpression von C1D sehr viel empfindlicher als normale Zellen reagieren. Für normale Zellen bestehen
5 deshalb keinerlei Nebenwirkungen, während Tumorzellen den sicheren Zelltod erleiden.

Kurze Beschreibung der Figuren:

10 **Fig. 1** zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Mensch

Fig. 2 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Maus

15 **Fig. 3** zeigt den zeitlichen Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Fluoreszenzmikroskopie; Anregung: 480 nm, Emission: 520 nm)

20 **Fig. 4** zeigt Beispiele von morphologischen Besonderheiten im Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Phasenkontrastaufnahmen)

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

25

Beispiel 1: Induktion von Apoptose durch Expression des C1D-Gens

- pcDNA 3 - C1D-Expressionskonstrukte

Die im Bluescript-Vektor (KS+, Fa. Stratagene) klonierte cDNA kodierend für
30 menschliches bzw. murines C1D wurden durch PCR amplifiziert. Dabei wurden die folgenden Primer verwendet:

für menschliche cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATTAATGAAGACTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACTTAACCTTTTACTTTTTCCTTTATTGGCAAC

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 118 bis Base 540 gemäß Fig. 1)

für Maus cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATGAATGAAGATTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACGTGTTTGCTTTTCCCTTTATTAGCCACTTT

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 78 bis Base 500 gemäß Fig. 2)

Mit diesen Primern wurde eine Kpn-Schnittstelle vor dem ATG-Startcodon und eine Sal I-Restriktionsstelle vor den Stop-Kodon eingeführt (sodaß das Stopkodon entfiel). Die PCR-Reaktion wurde mittels PCR Kit der Fa. Clontech (K1906-1) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der Kitbestandteile in 50 µl Volumina durchgeführt:

Wasser	38,8 µl
10x Puffer	5 µl
Mg-Acetat	2,2 µl
Primer-Vor	1 µl (10 µM)
Primer-Rück	1 µl (10 µM)
C1D-Templat	5 µl (500 ng)
50x dNTP	1 µl
Kit-Polymerase	1 µl

Cyclerprogramm:

1. Initiale Denaturierung 94°C, 1 Min.
 2. Denaturierung 94°C, 30 Sec.
 3. Annealing-Extension 68°C, 3 Min.
 4. End-Extension 68°C, 3 Min.
 5. Abkühlung 4°C
- Schritte 2/3 werden 35 mal durchgeführt

5 Nach Restriktionsverdau des Amplifikationsansatzes mit Kpn I/Sal I wurden die Fragmente zunächst im Bluescript-Vektor (Kpn I/Sal I - vorbehandelt) rekloniert. Nach Ausschneiden der Fragmente aus dem Bluescript-Vektor mit Kpn I/Not I konnten die Sequenzen im entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Fa. InVitrogen) einkloniert werden.

- pcDNA3-C1D-EGFP-Expressionskonstrukte

10 Die Fusion zwischen C1D und GFP (grün fluoreszierendes Protein von Aequorea Victoria) mit durchgehendem Leserahmen erfolgte auf der pBluescript-Ebene. Dazu wurden die oben beschriebenen pBluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I)-Plasmide durch Verdau mit Sal I/Hind III geöffnet.

15 Die für EGFP kodierende Sequenz (Fa. Clontech; EGFP bedeutet "enhanced green fluorescent protein" und ist eine von der Fa. Clontech hergestellte Mutante, die verbesserte Eigenschaften hinsichtlich Excitation/Emission hat) wurde durch PCR amplifiziert. In dieser PCR wurden die folgenden Primer eingesetzt:

Primer vorwärts:

20 5'-GGGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC

Primer rückwärts:

5'-CCAAGCTTTGGAATTCTAGAGTCGCGGCCGCTTTA

um am 5-Ende eine Sal I-Stelle und am 3'-Ende (hier nach dem Stopcodon) eine Hind III-Stelle einzufügen. Die PCR wurde analog wie zuvor beschrieben durchgeführt.

30 Nach Verdau der PCR-Amplifikationsprodukte mit Sal I und Hind III konnten diese in die oben vorbereiteten Bluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I) (Hind III)-Plasmide ligiert werden. Danach wurde die Fusionskassette (Kpn I)-C1D-EGFP-(NotI) durch entsprechenden Verdau aus dem Bluescript-Vektor herausgeschnitten und in den entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Kpn I/Not I) rekloniert.

- Transfektion der Vektoren in Tumorzellen

35 Die oben erhaltenen Expressionsvektoren wurden getrennt voneinander per

Elektroporation (Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, S. 7161-7165 (1984) bzw. Lipofektion (SuperFect Transfection Reagent Handbook, Fa. Qia-gen, Hilden, 02/97, 1997) in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors transfiziert. Transfizierte (lebende Zellen) wurden im Mikroskop (Fluoreszenzoptik) beobachtet und fotografiert (Fig. 3).

Etwa 12 Stunden nach Transfektion haben 20-60% eine schwache Grünfluoreszenz im Zellkern (nicht gezeigt). Dies verweist auf die zunächst moderate Expression des Fusionsproteins. Morphologisch sind keine Besonderheiten zu erkennen. Ab etwa 24 Stunden nach Transfektion des Vektorkonstrukts treten in einzelnen Zellen Verdichtungen des Fusionsproteins auf (Fig. 3 links). Diese Verdichtungen sind auch im Phasenkontrastbild (Fig. 4) zu beobachten. Im weiteren zeitlichen Verlauf werden diese Verdichtungen stärker (Fig. 3 von links nach rechts) und das Phasenkontrastbild (Fig. 4) entspricht dem typischen Bild einer Zelle in Apoptose.

Nicht alle Zellen, die gleichzeitig transfiziert wurden, zeigen auch gleichzeitig die im Bild zu sehende übersteigerte Expressionsrate des Fusionsproteins. Zellen wie in Fig. 3 links werden auch noch nach 48-72 Stunden beobachtet, wohingegen andere Zellen schon den Endpunkt (Fig. 3 rechts) erreicht haben. Dies zeigt, daß die Zellen einer Kultur "gestaffelt" in den Apoptose-Prozeß eintreten. Bei ausreichend hoher Transfektionsrate sind letztlich alle Zellen einer Kultur, auch solche, die nicht transfiziert wurden, abgetötet. Dieser Zeitpunkt ist abhängig von der initialen Transfektionsrate. Durch die Apoptose der transfizierten Zellen werden Faktoren abgegeben, die für nicht-transfizierte Zellen in der Kultur schädlich sind und schließlich zu Abtötung auch dieser nicht-transfizierten Zellen führen (sog. "Bystander-Effekt").

Es soll angemerkt werden, daß GFP (grün fluoreszierendes Protein von Aequorea Victoria) nur zur Unterscheidung transfizierter und nicht-transfizierter Zellen verwendet wurde bzw. zur Sichtbarmachung der Überexpression. GFP-Expression allein hat keinerlei Effekt auf die Zellmorphologie bzw. auf die Überlebens-

5 fähigkeit von Zellen. GFP-Fusionsproteine haben grundsätzlich die funktionellen Eigenschaften (und auch die intrazellulären Verteilungen) wie das funktionelle Genprodukt. Die in den Figuren gezeigten apoptotischen Prozesse beruhen deshalb auf einer C1D-Funktion. Die gezeigte Morphologie (und der Zellzahlverlust) wurde in Kontrollexperimenten auch durch Konstrukte bewirkt, die nur die C1D-Sequenz enthielten (z.B. durch die oben beschriebenen pcDNA 3-C1D-Expressionskonstrukte).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen durch Überexpression des C1D-Gens.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen Tumorzellen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das C1D-Genprodukt die Aminosäuresequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist, wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zellen mit einem Expressionsvektor enthaltend
 - (a) die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert, oder
 - (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.transfiziert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das in den Zellen endogen enthaltene C1D-Gen stimuliert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Promotor des endogenen C1D-Gens durch extrazelluläre Faktoren stimuliert wird.

K 2543

Zusammenfassung

Verfahren zur Auslösung von Apoptose

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose, in dem in Zellen, insbesondere Tumorzellen, das C1D-Gen überexprimiert wird. Dies geschieht beispielsweise durch Einbringen entsprechender Expressionskonstrukte in die Zellen oder durch exogene Stimulation der Expression des zelleigenen C1D-Gens.

10

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Mensch-C1D cDNA

```

CTT TCC GGG AGA CTG GAG TCG AAG GCC GTG AGT ATT TTC TAA GCC
AGT GTT TAG AGA GTA TGT GAG GCA AGA GTA CCT ATA GAA CCC GGA
GGA GGG TGA GGA GCA GAG CTG GCC ATA ATG GCA GGT GAA GAA ATT
                                     M  A  G  E  E  I
AAT GAA GAC TAT CCA GTA GAA ATT CAC GAG TAT TTG TCA GCG TTT
N   E   D   Y   P   V   E   I   H   E   Y   L   S   A   F
GAG AAT TCC ATT GGT GCT GTG GAT GAG ATG CTG AAG ACC ATG ATG
E   N   S   I   G   A   V   D   E   M   L   K   T   M   M
TCT GTT TCT AGA AAT GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAT CCA CTT GAA
S   V   S   R   N   E   L   L   Q   K   L   D   P   L   E
CAA GCA AAA GTG GAT TTG GTT TCT GCA TAC ACA TTA AAT TCA ATG
Q   A   K   V   D   L   V   S   A   Y   T   L   N   S   M
TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACC CAA GGA GTT AAT CCT AAG GAA CAT
F   W   V   Y   L   A   T   Q   G   V   N   P   K   E   H
CCA GTA AAA CAG GAA TTG GAA AGA ATC AGA GTA TAT ATG AAC AGA
P   V   K   Q   E   L   E   R   I   R   V   Y   M   N   R
GTC AAG GAA ATA ACA GAC AAG AAA AAG GCT GGC AAG CTG GAC AGA
V   K   E   I   T   D   K   K   K   A   G   K   L   D   R
GGT GCA GCT TCA AGA TTT GTA AAA AAT GCC CTC TGG GAA CCA AAA
G   A   A   S   R   F   V   K   N   A   L   W   E   P   K
TCG AAA AAT GCA TCA AAA GTT GCC AAT AAA GGA AAA AGT AAA AGT
S   K   N   A   S   K   V   A   N   K   G   K   S   K   S
TAA CTT TTT GGT TTT GAT GTA CAC ATA TTC AAA AAG TAC ATT AAT
ATG TAA TCA CAG TAA TAT GTA AAG CTA AAT ACT TCC TCT CCA AAG
ATC Aat TAT CTT TAT TGA TTA GCA CTG AGG ATT TTA ACA TTG TGA
TAT ATT ATA TAT TTA TAA TTT ACC ATC TCT TGA TGA GAC TCT TAT
TTC TTT ATA TAG GTC AGT CTT GCA AGT ACC ATT TTA TAA GCA GCT
GTG AAA TTT AAG TGA AAT GTT CTT TGT AAA CAT TTG TAC TAT TTT
AAA TGA ATA ATG ACC TTA TGA AGT ATG CTA TCT GTA GGC TGA AAT
TAT AGG TAC ATC TGT TTT CAC TAT ATG ATA TTA AGA AAG CGT GAA
ATG ACT TAA ATG TTC ATT TTT TTC TGT ATA GAT ACT TTA TCA TGT
TTT CAT GAT TTT AGG AAT TAC TGC TTT GTT GAT ATT CAA AGT GTG
AAA CTA AAA GTT TAT GGT TGT ACT TTA ATT CTT GGC ATG TTG CCT
CTA TGT CCC ATT TAA AAT AAA ATA CAT TCT CAT TAA CTT TAG ATG
GGA AAT AAG GTT GTA TGT TGA TGG ATG AAT TTT GGC ATG ATG ACT
GTA CTC TCA ATA AAG GCT GAA AAT GTT GTA AAA.....

```

Fig. 1

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Maus-C1D cDNA

GAA	GCC	GTG	TCA	TGG	CGT	CAT	CAT	CGT	GCG	ACC	TAT	TTC	CCG	GAG	CA
ACA	GGC	GTC	CAC	GGT	ATT	GAG	TTG	GTC	ACA	ATG	GCA	GGT	GAA	GAA	
ATG	AAT	GAA	GAT	TAT	CCC	GTA	GAA	ATT	CAC	GAG	TCT	TTA	ACA	GCC	
M	N	E	D	Y	P	V	E	I	H	E	S	L	T	A	
CTG	GAG	AGC	TCC	CTG	GGT	GCT	GTG	GAC	GAC	ATG	CTG	AAG	ACC	ATG	
L	E	S	S	L	G	A	V	D	D	M	L	K	T	M	
ATG	GCT	GTT	TCT	AGA	AAC	GAG	TTG	TTG	CAG	AAG	TTG	GAC	CCA	TTG	
M	A	V	S	R	N	E	L	L	Q	K	L	D	P	L	
GAA	CAA	GCA	AAG	GTG	GAT	TTA	GTT	TCT	GCA	TAC	ACC	TTA	AAT	TCA	
E	Q	A	K	V	D	L	V	S	A	Y	T	L	N	S	
ATG	TTT	TGG	GTT	TAT	TTG	GCA	ACT	CAA	GGA	GTT	AAT	CCC	AAA	GAG	
M	F	W	V	Y	L	A	T	Q	G	V	N	P	K	E	
CAT	CCA	GTG	AAG	CAG	GAA	CTG	GAA	AGA	ATC	AGA	GTC	TAC	ATG	AAC	
H	P	V	K	Q	E	L	E	R	I	R	V	Y	M	N	
AGA	GTT	AAA	GAA	ATA	ACA	GAC	AAG	AAG	AAG	GCT	GCC	AAG	CTG	GAC	
R	V	K	E	I	T	D	K	K	A	A	K	L	D		
AGA	GGT	GCT	GCT	TCG	AGA	TTT	GTC	AAG	AAG	GCA	CTC	TGG	GAA	CCC	
R	G	A	A	S	R	F	V	K	K	A	L	W	E	P	
AAA	CGA	AAA	AGC	ACA	CCA	AAA	GTG	GCT	AAT	AAA	GGG	AAA	AGC	AAA	
K	R	K	S	T	P	K	V	A	N	K	G	K	S	K	
CAC	TAA	TCT	TTT	GGT	TTT	GAT	GTA	CAT	GTT	TTC	AAA	AAG	TAC	ATC	
H															
CTT	TTT	AAT	CAG	TTT	ACA	ATG	TAG	TTA	TGT	GAC	CAT	GTG	GTG	TTT	
AAA	TGG	ATT	CCT	TTT	GGA	ATT	CAT	GTA	TAA	ATT	TAC	ACA	TTA	CAT	
TTG	TGA	TAC	TGA	ATC	TTT	TTT	TTG	CTG	AGA	AAG	ATT	AAG	TTG	TCT	
TTG	TTG	ATT	TTC	ATA	TAA	AGC	ATC	ATG	ATG	TGT	TTA	ATA	TTG	TAA	
GAT	ATT	CTA	TAA	GCA	GTT	GTG	AAA	TCC	AAA	TGT	TCT	CTG	TAA	ACA	
TTT	GTA	GTG	TTT	GAA	ATG	AAC	AAT	GAT	ATT	ATG	AAG	TGT	GCT	ATC	
TGT	AGA	CCT	CGA	GGT	GTA	AGG	ACA	TTT	GTT	TTC	AGT	AAT	GAT	GAG	
AAA	TAC	AGT	GAC	TTA	AAT	ACC	CAC	TCT	GTT	TCT	GTT	CAG	TTA	GTT	
CAA	CAT	GTT	TCG	TGA	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	GAG	TAA	TTC	TGT	CTT	
GAT	ATT	CAA	AGT	CAA	AAT	TGA	AAC	CTT	AAG	GCT	GTA	CTT	TAA	TTC	
TTC	ATG	TTC	CAT	TTA	AAA	TAA	AAT	GTT	CTC	ATT	AAC	TCT	GAT	GGA	
AAA														

Fig. 2

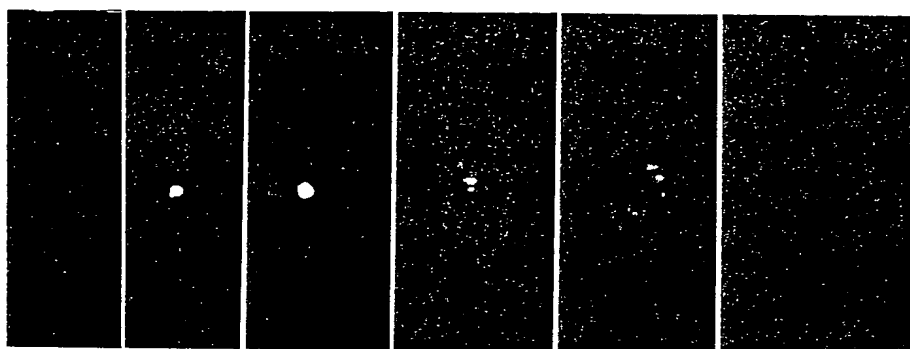


Fig. 3

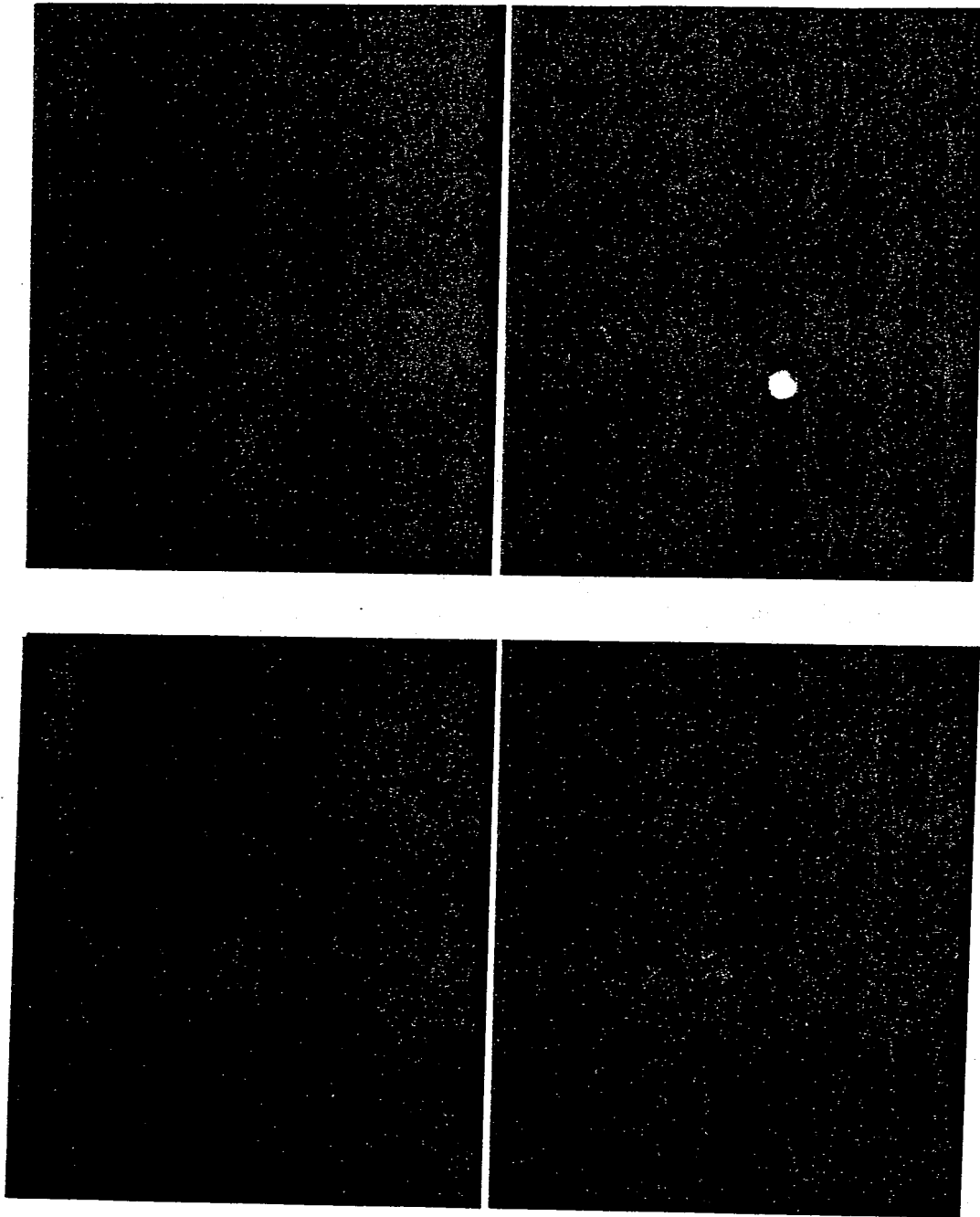


Fig. 4